АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА “ІНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ТРАНСФУЗІОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ”

Ружинська Олена Едуардівна

УДК 616.155.392:616-092

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН, ОСОБЛИВОСТІ ЇХ АПОПТОЗУ ТА ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ПРИ МІЄЛОДИСПЛАСТИЧНОМУ СИНДРОМІ

14.01.31 – гематологія та трансфузіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2007

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у ДУ “Інститут гематології та трансфузіології АМН України”

Науковий керівник

доктор медичних наук, старший науковий співробітник **Ісакова Людмила Михайлівна,** ДУ “Інститут гематології та трансфузіології АМН України”, заступник директора з наукової роботи, завідувач лабораторії цитології та імунології

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Кудрявець Юрій Йосипович,** Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, завідувач відділу експериментальних клітинних систем;

доктор медичних наук, професор **Базика Димитрій Анатолійович,** ДУ “Науковий центр радіаційної медицини АМН України”, заступник генерального директора з наукової роботи, завідувач відділу клінічної імунології Інституту клінічної радіології

Захист відбудеться “16” жовтня 2007 р. о 13 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.612.01 у ДУ “Інститут гематології та трансфузіології АМНУ” за адресою: 04060, м. Київ, вул. М. Берлинського, 12.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ “Інститут гематології та трансфузіології АМНУ” за адресою: 04060, м. Київ, вул. М. Берлинського, 12.

Автореферат розісланий “6” вересня 2007 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради **Г.П. Гащук**

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Мієлодиспластичний синдром (МДС) є найбільш неоднорідною групою клональних захворювань системи гемопоезу, що обумовлені змінами, які відбуваються як на рівні гемопоетичних клітин, так і на рівні стромального мікрооточення кісткового мозку (КМ) і характеризуються неефективним гемопоезом [Raza A. et al., 1995; Invernizzi R., 2002; Бебешко В.Г., 2004; Гайдукова С.Н., 2004]. Неефективний гемопоез є відображенням порушення процесів проліферації і диференціювання різних паростків кровотворення [Lichtman M.A., 2000; Mundle S.D., 2003]. Ці порушення можуть відбуватися внаслідок різноманітних генетичних аномалій, які зустрічаються приблизно у 30-50% випадків при первинному МДС і у 80% випадків при вторинному МДС і стосуються онкогенів або генів пухлинної супресії [Соболева Т.Н. и соавт., 1998; Christiansen D.H. et al., 2001; Hirai H., 2003; Hofmann W.-K. et al., 2004; Климкович Н.Н. и соавт., 2005].

До теперішнього часу відкритими залишаються питання щодо деяких патогенетичних аспектів МДС і, як наслідок, еволюції захворювання. Актуальність даної проблеми підтверджується численними спробами створення різноманітних прогностичних систем, кількість яких зросла до десяти з моменту публікації FAB-класифікації гемобластозів [Aul C. et al., 2002; Кулагин А.Д. и соавт., 2003; Cherian S. et al., 2005; Pirruccello S.J. et al., 2006]. Вивчення патогенезу МДС, крім того, ускладнюються тим, що дана патологія зустрічається достатньо рідко – 2,8-4,4 випадків на 100 тис. населення за рік [Oscier D.J., 1997; Alessandrino E.P. et al., 2001], а також труднощами при верифікації захворювання [Зумбос Н., 1999; Савва Н.Н. и соавт., 2001; Глузман Д.Ф., 2004] внаслідок значної його неоднозначності щодо клініко-гематологічних проявів, біологічних характеристик клітинного субстрату, а також перебігу [Герасимова Л.П. и соавт., 1999; Шмаров Д. А. и соавт., 2000; Френкель М.А. и соавт., 2001; Matsushima T. et al., 2003].

Безперечним досягненням останнього десятиріччя є встановлення ролі апоптозу в процесі лейкемо- та онкогенезу [Israels L.G. et al., 1999; Parker J.E., 2001; Rossi D. et al., 2003; Span L.F., 2005]. Багатьма дослідниками [Bouscary D. et al., 1997; Fenaux P. et al., 2002; Базика Д.А. і співавт., 2005] було проаналізовано функціонування апоптоз-регулюючих чинників (FAS-системи, транскрипту гена пухлинної супресії p53, медикаментозної резистентності P-gp, білків родини Bcl-2) та їх ролі в становленні як нормального, так і патологічного гемопоезу при різних онкогематологічних захворюваннях, у тому числі МДС. Проте методи і експериментальні моделі, що були використані для їх вивчення, демонструють досить суперечливі результати відносно рівня експресії цих маркерів апоптозу та характеру їх кореляційних взаємовідносин [Lepelly P. et al., 1996; Кохно А.В. и соавт., 2001; Choi J.W., 2002; Li X. et al., 2003; Ricciardi M.R. et al., 2004]. Крім того, деякі дослідники обмежуються

вивченням або певних клітинних популяцій [Su-rez L. et al., 2002; Торубарова Н.А. и соавт., 2003], або певних маркерів апоптозу [Davis R.E. et al., 1998]. Ці обмеження ускладнюють формування чітких прогностичних критеріїв перебігу і прогнозу захворювання на підставі оцінки рівня експресії апоптоз-регулюючих білків.

Також невирішеним залишається взаємозв'язок апоптотичних і проліферативних процесів при МДС, дослідження цієї проблеми є поодинокими [Bincoletto C. et al., 1998; Lin C.W. et al., 2002; Абдулкадыров К.М. и соавт., 2003]. Тому вивчення процесів клітинної кінетики дає можливість не тільки відстежити еволюцію пухлинного клону, виявити анеуплоїдні популяції клітин, але й оцінити ефективність терапії, що проводиться, оскільки насьогодні стандарти для лікування МДС остаточно не визначені.

Окрім того, дослідження, які направлені на комплексний аналіз апоптотичних і цитокінетичних параметрів гемопоезу у хворих на МДС, нечисленні і неадаптовані для їх практичного застосування. Враховуючи зазначене вище, подальша розробка цієї проблеми є доцільною як з теоретичної, так і з практичної точки зору.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках планових тем НДР ДУ "Інститут гематології та трансфузіології АМН України":

1. "Вивчення патогенетичних основ мієлодиспластичного синдрому". Шифр АМН.Ф.00.01, № державної реєстрації – 0100U002731 (2000-2004 рр.).

2. "Визначити основні закономірності морфофункціональних порушень імунокомпетентних клітин і змін імунітету при мієлоїдних новоутвореннях". Шифр АМН.Ф.02.05, № держреєстрації – 0105U000817 (2005-2007 рр.).

Мета роботи. Визначити особливості гемопоезу хворих на різні форми МДС з урахуванням морфофункціональних показників, маркерів апоптозу, цитокінетичних параметрів для встановлення диференційно-діагностичних і прогностичних критеріїв перебігу захворювання.

Задачі дослідження:

1. Дослідити цитоморфологічні, цитохімічні та імунофенотипові особливості гемопоетичних клітин у хворих на МДС порівняно з відповідними показниками при гострій мієлоїдній лейкемії (ГМЛ) і в контрольній групі.

2. Визначити рівень експресії ключових маркерів апоптозу – аннексіну V, антигену CD95 (FAS) і білка Bcl-2 – гемопоетичними клітинами КМ і периферичної крові (ПК) у хворих на різні форми МДС порівняно з аналогічними показниками в групі контролю і при ГМЛ.

3. Вивчити особливості розподілу гемопоетичних клітин у хворих на МДС і ГМЛ за фазами клітинного циклу (КЦ) і співставити їх з основними показниками мієлограми і гемограми.

4. Оцінити можливість використання морфоцитохімічних, апоптотичних і цитокінетичних характеристик гемопоетичних клітин в якості диференційно-діагностичних і прогностичних критеріїв МДС.

Об'єкт дослідження. Гемопоетичні клітини КМ і ПК хворих на різні форми МДС і ГМЛ.

Предмет дослідження. Морфофункціональні і цитокінетичні особливості гемопоетичних клітин у хворих на МДС і ГМЛ.

Методи дослідження. Метод світлової мікроскопії для морфологічної і цитохімічної оцінки біологічного матеріалу: підрахунок лейкограми і мієлограми, напівкількісний метод оцінки кінцевого продукту п'яти цитохімічних реакцій – мієлопероксидази (МП), кислої фосфатази (КФ), неспецифічної естерази (НЕ), глікогену (PAS), наявність сидеробластів і сидероцитів; метод протокової цитофлюориметрії для аналізу імунофенотипового профілю гемопоетичних клітин і рівня експресії ними маркерів апоптозу – FAS-рецептору, білка Bcl-2, аннексіну V (визначення кількості апоптотичних клітин) та оцінки параметрів КЦ за ДНК-гістограмою; методи статистичної обробки даних для непараметричних досліджень.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше дана комплексна оцінка цитокінетичних і апоптоз-асоційованих особливостей гемопоезу хворих на різні форми МДС в співставленні з морфоцитохімічними характеристиками гемопоетичних клітин, що розширює сучасні уявлення стосовно патогенезу даного захворювання.

Визначено ступінь дисбалансу про- і антиапоптотичних процесів у гемопоетичних клітинах хворих на МДС і ГМЛ, а також участь в цих процесах клітин різних ліній гемопоезу та ступеня їх диференціювання.

Вперше у хворих на МДС і ГМЛ за параметрами КЦ виявлено високий, в порівнянні з контролем, проліферативний потенціал як диплоїдних, так і анеуплоїдних популяцій гемопоетичних клітин. Показано, що, незалежно від захворювання, у хворих з відсутністю анеуплоїдії високе значення проліферативного потенціалу гемопоетичних клітин КМ відображає ступінь збереження пулу нормальних паростків кровотворення: мієлоїдного при МДС та еритроїдного при ГМЛ. Виявлено збільшення кількості клітин у стадії спокою при еволюції захворювання внаслідок зростання маси бластних клітин. Встановлено, що анеуплоїдна популяція гемопоетичних клітин має більш високий, в порівнянні з диплоїдною фракцією, проліферативний потенціал. Це обумовлює швидку експансію пухлинного клону. Наявність ДНК-анеуплоїдії необхідно враховувати при оцінці прогнозу захворювання.

Встановлено, що показник кількості гемопоетичних клітин в апоптозі (з пороговим значенням 20%) і величина проліферуючого клітинного пулу (з пороговим значенням 14,6%) для хворих на МДС, рівень експресії протоонкогену Bcl-2 (з пороговим значенням 20%) для хворих на ГМЛ, а також наявність анеуплоїдної популяції клітин для всіх категорій хворих є

достовірними прогностично значущими чинниками, що характеризують процес еволюції захворювання.

Виявлено маркерні зміни імунофенотипового профілю гемопоетичних клітин при МДС (рівень експресії антигену клітин-попередників CD33 і активаційного антигену CD45), а також рівня активності МП, КФ, НЕ і PAS-позитивних речовин гемопоетичних клітин хворих на МДС і ГМЛ.

Практичне значення одержаних результатів. Запропоновано комплекс ознак, які можуть бути використані в якості додаткових критеріїв оцінки ступеня малігнізації клітинних популяцій при МДС і ГМЛ, а також диференційно-діагностичних критеріїв при верифікації важких форм цитопеній/гемодепресій пухлинної і непухлинної природи. Використання даних критеріїв може стати основою для вибору раціональних, патогенетично обгрунтованих програм лікування мієлодиспластичних станів.

На підставі оцінки прогностичного значення рівня експресії апоптоз-асоційованих білків Bcl-2 і CD95 у хворих на ГМЛ запропоновано їх використання для визначення чутливості лейкемічного клону до поліхіміотерапії, що застосовується (нововведення “Метод оцінки маркерів апоптозу лейкемічних клітин хворих на гемобластози для прогнозування їх відповіді на поліхіміотерапію”).

Показана доцільність використання методу протокової цитофлюориметрії для отримання і аналізу різноманітних морфофункціональних параметрів, що характеризують неефективний гемопоез і ступінь злоякісної дисплазії клітинних популяцій.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто проведено патентний пошук, сформульована ідея роботи, підібрані і проаналізовані літературні джерела. Розроблено дизайн дослідження, самостійно освоєні методики для виконання поставлених завдань, сформовані групи спостереження. Моніторинг хворих, верифікація діагнозу та одержання біологічного матеріалу проводилися спільно із співробітниками відділення захворювань системи крові ДУ “ІГТ АМНУ” (зав. відділенням – д.м.н., проф. Третяк Н.М.), а також із співробітниками клініки гематології Головного військового клінічного шпиталю Міністерства Оборони України (начальник клініки – к.м.н. Гончаров Я.П.), за що висловлюю їм свою вдячність. Підрахунок лейко- і мієлограми, оцінка результатів цитохімічних реакцій, підготовка клітинних зразків для дослідження на протоковому цитофлюориметрі FACScan (BD, USA), а також аналіз параметрів КЦ і оцінка апоптотичного індексу проведені дисертантом самостійно. Імунофенотипові дослідження, оцінка рівня експресії рецепторної молекули FAS і внутрішньоклітинного протоонкогену Bcl-2 методом протокової цитофлюориметрії виконані спільно з провід. наук. співр. лабораторії цитології та імунології, к.б.н. Гордієнко А.І., за що висловлюю їй свою щиру подяку.

Дисертантом особисто проведено аналіз одержаних даних, написано всі розділи роботи, сформульовано висновки і практичне значення результатів дослідження.

Апробація результатів досліджень. За матеріалами дисертації зроблено 6 доповідей: на II з'їзді онкологів країн СНД (Київ, 2000), IV з'їзді гематологів і трансфузіологів (Київ, 2001), науково-практичній школі-семінарі "Актуальні проблеми протокової цитометрії" (Київ, 2003), Всеукраїнській науково-практичній конференції "Впровадження досягнень теоретичної медицини в практику охорони здоров'я" (Київ, 2004), науковому семінарі у рамках спеціалізованої міжнародної виставки "Індустрія охорони здоров'я – 2005" (Київ, 2005), науково-практичній конференції "Актуальні проблеми гематології і трансфузійної медицини" (Львів, 2005).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових праць: 7 статей, з них – 5 в рекомендованих ВАК України виданнях, і 9 тез. Одержано деклараційний патент на корисну модель "Спосіб діагностики мієлодиспластичного синдрому", 2004 рік (№4616). Опубліковано 2 нововведення в Інформаційному бюлетені журналу АМН України: "Метод оцінки маркерів апоптозу лейкемічних клітин хворих на гемобластози для прогнозування їх відповіді на поліхіміотерапію"; "Використання морфологічних ознак та індексу апоптозу нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові і кісткового мозку для діагностики МДС та гемодепресій іншого походження".

Структура та обсяг дисертації. Робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків та списку використаних 209 літературних джерел, з яких 17 вітчизняних та 192 іноземних. Дисертація викладена на 150 сторінках машинописного тексту, містить 24 таблиці та 21 рисунок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі представлені класифікаційні системи МДС, морфофункціональні особливості гемопоетичних клітин при цій патології (морфологічна, цитохімічна та імунофенотипова характеристика) та її основні патогенетичні ланки (сучасні уявлення щодо апоптозу, співставлення апоптотичних і проліферативних процесів та їх ролі у патогенезі МДС). Аналіз літературних даних показав, що МДС і дотепер залишається недостатньо вивченою патологією як відносно верифікації діагнозу, так і відносно його перебігу і прогнозу внаслідок значної варіабельності біологічних характеристик субстратних клітин. Тому подальше вивчення патогенетичних факторів і створення на підставі отриманих результатів додаткових диференційно-діагностичних і прогностичних критеріїв є доцільним.

Матеріали і методи досліджень. В ході виконання роботи було проведено 1190 досліджень біологічного матеріалу від 79 хворих на МДС, ГМЛ-post МДС та ГМЛ de novo. Всі пацієнти на МДС (48 осіб) були поділені відповідно до FAB-класифікації: РА – 12, РАКС – 1, РАНБ – 13, ХММЛ – 21, РАНБ-т – 1. Верифікація діагнозу проводилася на підставі загальноклінічних і цитоморфологічних методів дослідження. Групу порівняння складали наступні нозологічні одиниці: ГМЛ-post МДС – 11 хворих (серед них 3 пацієнти досліджувалися в динаміці, починаючи від РА) та ГМЛ de novo – 24 хворих. До контрольної групи входили 14 практично здорових осіб, які не страждали на онкогематологічну патологію. Хворі знаходились під спостереженням на протязі 2000-2006 рр. Серед пацієнтів на МДС було 30 чоловіків (медіана 59 років) та 18 жінок (медіана 68 років) у віці від 19 до 85 років. Хворі на ГМЛ відповідали наступним варіантам лейкемій (згідно FAB-класифікації): ГМЛ-M_2 – 5 хворих, ГМЛ-M_4 – 22, ГМЛ-M_5 – 8 хворих та мали вік від 24 до 91 року.

Усі дослідження проводились, у більшості випадків, до призначення курсу хіміотерапії, або у перервах між ними.

Для кількісної та якісної оцінки стану гемопоезу хворих на МДС та ГМЛ проводили підрахунок гемограми (гемоглобін, еритроцити, тромбоцити, лейкоцитарна формула), мієлограми, відмічали наявність диспластичних змін гемопоетичних клітин у мазках ПК та КМ, пофарбованих за Паппенгеймом.

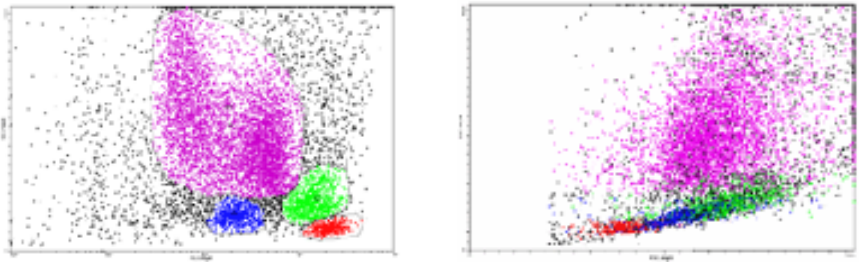
Особливості ензимохімічної організації гемопоетичних клітин вивчали з урахуванням активності основних цитохімічних ферментів: МП (за методом Леле), КФ (за Голдбергом і Барка), НЕ (за Пірсом) та рівня полісахаридів (за Мак-Манусом і Хочкіссом). Інтенсивність цитохімічних реакцій оцінювали за напівкількісним принципом, запропонованим Кеплоу в модифікації Астальді і Верга, шляхом розрахунку середнього цитохімічного коефіцієнту (СЦК, у.о.) за трибальною шкалою. Морфологічні і цитохімічні дослідження проводили на світлооптичному мікроскопі Nikon (Японія) із збільшенням 100х10.

Для аналізу імунофенотипового профілю субстратних клітин застосовували метод прямого імунофлюоресцентного фарбування з використанням моноклональних антитіл (МКАТ), що входять в набір “Acute Leukemia Phenotyping Kit” (BD, USA) – CD34, HLA-DR CD33, CD13, CD14.

З метою дослідження патогенетичних факторів МДС визначали рівень експресії апоптоз-асоційованих маркерів: відносна кількість (%) аннексін-позитивних- (апоптотичних), $CD95^+$- та $Bcl\text{-}2^+$-клітин в зразках КМ і ПК хворих. Для оцінки кількості апоптотичних клітин використовували методику згідно протоколу, який входить до набору ANNEXIN V-FITC APOPTOSIS DETECTION KIT I (BD PHARMINGEN, USA). Метод базується на особливості мембран апоптотичних клітин за певних умов зв’язувати білок аннексін V. Зв’язування МКАТ CD95-PE та Bcl-2-FITC з

мембраною гемопоетичних клітин відбувалося згідно методики фірми-виробника реактиву (BD PHARMINGEN, USA).

Аналіз рівня експресії маркерів апоптозу передбачав виділення регіонів окремих клітинних популяцій згідно параметрам їх флюоресценції і бокового світлорозсіювання (CD45/SSC) – лімфоїдних, моноцитарних, гранулоцитарних і бластних – з метою оцінки їх внеску в процеси, що вивчаються (рис. 1).



а б

Рис. 1 а, б. Гетерогенність клітинних популяцій КМ хворого на ХММЛ.

а. Популяції (регіони) клітин виділені згідно попереднього аналізу в режимі CD45/SSC. *б.* Точковий графік (dot plot) наведено відповідно до параметрів прямого (вісь абсцис) та бокового (вісь ординат) світлорозсіювання (FSC/SSC) гемопоетичних клітин: червоний колір – лімфоцити; синій – бласти; зелений – моноцити; рожевий – гранулоцитарні клітини.

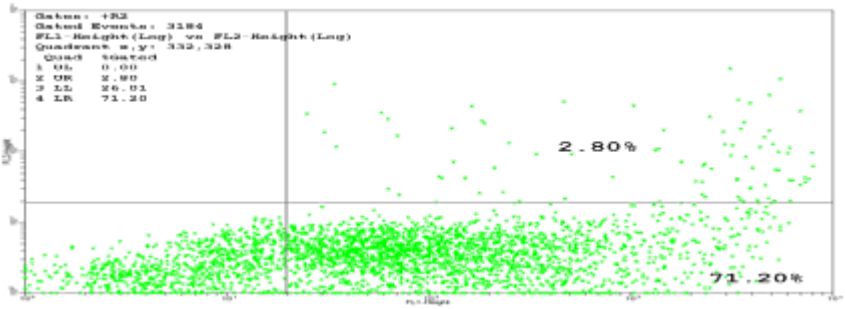


Рис. 1 в. Кількість апоптотичних (аннексін-позитивних) клітин (71,2%) пухлинного клону КМ (бластно-моноцитарний регіон) хворого на ХММЛ. Вісь абсцис – рівень експресії білка аннексін V, вісь ординат – рівень експресії інтеркалюючого барвника пропідій йодид (PI).

Для дослідження проліферативної активності гемопоетичних клітин та наявності анеуплоїдних клітинних популяцій вивчали параметри КЦ за модифікованою методикою Nicoletti (1991). Результати дослідження наведені у вигляді ДНК-гістограм, які були проаналізовано із застосуванням

спеціалізованої математичної програми ModFit LT V2.01 (BDIS, USA) та з урахуванням рекомендацій DNA Cytometry Consensus Conference (1993). Для аналізу параметрів КЦ і плоїдності використовували наступні показники: співвідношення диплоїдної і анеуплоїдної клітинних фракцій в зразку з одночасним підрахунком індексу ДНК для анеуплоїдної популяції (DI); відсотковий розподіл клітин за основними фазами циклу для кожної фракції (G0/1 – фаза спокою, S – фаза синтезу, G2/M – премітотична фаза і мітоз).

Всі цитометричні дослідження здійснювали на протоковому аналізаторі FACScan (BD, USA), що має аргоновий лазер з довжиною хвилі 488 нм та використовує програми збору даних LYSYS II (Ver. 1.1).

Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакету програм Statsoft Statistica v. 6.0. Достовірність міжгрупових відмінностей за певним показником визначали згідно непараметричного U-критерія Манна-Уїтні. Для визначення наявності кореляції між окремими показниками використовували непараметричний критерій Спірмана. Для аналізу виживаності хворих застосовували метод Каплана-Мейєра. Оцінку залежності загальної виживаності від досліджуваних параметрів здійснювали методом регресійного аналізу за Коксом. При визначенні достовірної різниці у виживаності хворих в межах однієї нозології залежно від величини досліджуваного параметру використовували метод регресійного аналізу за Коксом-Мантелом.

Результати досліджень, їх аналіз та узагальнення. ***Морфоцитохімічна та імунофенотипова оцінка гемопоетичних клітин хворих на МДС.*** За даними гемограм показники рівня гемоглобіну та кількості еритроцитів у хворих на різні форми МДС не мали достовірних відмінностей. Однак, якщо брати до уваги всіх хворих на МДС, спостерігались достовірні розбіжності у значенні даних показників відносно норми: (84,2±4,4) г/л і (2,6±0,2)х10^{12}/л при МДС та (123,7±3,4) г/л і (4,5±0,2)х10^{12}/л в контрольній групі. При цьому найбільш низькі значення рівня гемоглобіну, кількості еритроцитів, лейкоцитів та тромбоцитів були характерні для хворих на РАНБ. Між хворими на МДС та ГМЛ стосовно показників ПК не було відмічено достовірних розбіжностей, окрім кількості тромбоцитів. Його значення у хворих на ГМЛ post МДС мало вірогідно більш низький рівень порівняно з аналогічним при МДС ((47,4±10,2)х10^9/л та (133,8±26,9)х10^9/л відповідно). Аналіз лейко- та мієлограм пацієнтів з МДС виявив звуження гранулоцитарного паростка (p=0,03) за рахунок збільшення кількості бластних клітин, найбільша кількість яких спостерігалася у хворих на РАНБ та, в незначній мірі, моноцитів. Слід зазначити, що при МДС, незалежно від форм, картина КМ і ПК характеризувалася вираженими ознаками дизгемопоезу, які спостерігалися також і у деяких хворих на ГМЛ-post МДС. Найчастіше констатували порушення еритропоезу (особливо у хворих на РА) та мієлопоезу.

Оцінка цитохімічних реакцій вказує на наявність стійких змін ензимохімічної організації гемопоетичних клітин, що є відображенням

порушень у їх функціонуванні. У хворих на МДС було виявлено достовірні зміни за рівнем ферментативної активності в порівнянні з нормою: збільшення активності МП, PAS-позитивних речовин, КФ і НЕ в бластних клітинах при знижені активності МП і кількості гранул глікогену в нейтрофільних гранулоцитах (НГ); підвищення активності КФ і НЕ відмічалося в усіх гемопоетичних та імунокомпетентних клітинах. Ті ж тенденції спостерігалися і в групі пацієнтів з ГМЛ. При прогресуванні захворювання (трансформація МДС у ГМЛ) відбувається збільшення, іноді значне (МП, НЕ), рівня активності всіх цитохімічних ферментів в бластних клітинах. Маркерною ознакою ступеня малігнізації процесу є рівень активності НЕ, оскільки існує пряма кореляція між цим показником і кількістю бластів у КМ (Spearman, p=0,0004) та ПК (Spearman, p=0,008) хворих на МДС і ГМЛ. При цьому активність НЕ в бластних клітинах та НГ у пацієнтів з ГМЛ була достовірно вищою, ніж при МДС. Гемопоетичні клітини хворих на МДС характеризувались появою активності НЕ в значній кількості НГ (іноді до 80% клітин мали цей фермент, який в нормі є відсутнім) та зниженням його активності в моноцитах, які в нормі є високо-позитивними. Іншим інформативним показником перебігу захворювання є зменшення активності МП в НГ з одночасним підвищенням в них активності КФ, оскільки перший цитохімічний показник має зворотній, а другий – прямий достовірний взаємозв'язок з кількістю бластних клітин як в КМ (Spearman, p=0,02), так і в ПК (Spearman, p=0,03). Помітні відхилення виявляються не тільки в зміні активності ферменту, але і в зменшенні кількості клітин, що містять його: у окремих хворих кількість пероксидазо-позитивних НГ КМ знижувалася до 16% при нормі 100%. Найбільші відхилення в цьому плані були помічені при більш просунутих формах МДС (РАНБ, ХММЛ). Всі наведені вище факти свідчать на користь порушення процесів диференціювання клітин, їх функціональної неповноцінності, а, отже, наявності неефективного гемопоезу.

Підтвердженням цього є аналіз імунофенотипового профілю гемопоетичних клітин хворих на МДС (табл. 1).

Таблиця 1

Імунофенотип гемопоетичних клітин хворих на МДС

	CD34			HLA-DR			CD33			CD13			CD14		
	1	*2*	*3*	*1*	*2*	*3*	*1*	*2*	*3*	*1*	*2*	*3*	*1*	*2*	*3*
КМ	3,2 ± 1,3	11,7 ± 3,6	5,4 ± 1,3	32,3 ± 2,9	59,2 ± 19,7	10,7 ± 1,2	6,0 ± 0,9	78,5 ± 7,6	77,4 ± 10,3	7,3 ± 0,8	62,3 ± 5,9	81,5 ± 4,1	1,8 ± 0,5	44,9 ± 7,2	12,3 ± 5,3
ПК	1,7 ± 1,	9,1 ± 3,	3,9 ± 1,	15,7 ± 3,	61,9 ± 6,	8,1 ± 3,	3,9 ± 1,	81,6 ± 7,	58,6 ± 10	4,7 ± 1,	81,2 ± 6,	91,0 ± 2,	3,6 ± 2,	66,9 ± 6,	9,1 ± 2,

	0	1	6	1	0	6	4	1	,2	7	0	7	0	4	8

Примітка. *1, 2, 3* – рівень експресії відповідних АГ в лімфоїдному (1), моноцитарному/бластному (2) і гранулоцитарному/бластному (3) регіонах відповідно. Позитивним є рівень експресії, який перевищує 20% бар'єр.

Всі субстратні клітини, незалежно від форми захворювання, показали достатньо високий рівень експресії антигенів (АГ) HLA-DR, CD33 і CD13, який демонструє наявність комітації гемопоетичних клітин у мієлоїдному напрямі. При цьому була відмічена аномально висока експресія антигену клітин-попередників CD33 в популяції гранулоцитів. Всі хворі на МДС характеризувалися зниженням рівня експресії пан-лейкоцитарного антигену CD45 клітинами КМ і ПК. Враховуючи важливе значення цього АГ в процесі активації клітин, даний факт також може свідчити щодо прояву функціональної неповноцінності лейкоцитів.

Згідно регресійного аналізу за Коксом, деякі морфофункціональні параметри клітин мали прогностичну цінність для хворих МДС стосовно загальної виживаності: відносна кількість бластних клітин (p=0,05) і НГ (p=0,004) КМ, рівень активності в них МП (p=0,03) і КФ (p=0,003), рівень експресії антигенів CD45 (p=0,04) і CD14 (p=0,001). Згідно даних Arrovo J.L. et al. (2004) хворі на МДС з кількістю бластів в мієлограмі більше 5% і гранулоцитів менше 49% мають більш несприятливий прогноз. Виходячи з одержаних нами даних, згідно статистичного аналізу межу кількості НГ КМ обстежених пацієнтів можна зменшити до 33%, що поділяє всіх хворих на МДС на дві майже рівні групи, які достовірно відрізняються між собою по виживаності (Cox-Mantel Test, p=0,01).

Характеристика апоптоз-асоційованих маркерів хворих на МДС. Апоптоз є багатоетапним процесом, у регуляції якого беруть участь декілька основних чинників, серед яких – білки родини BCL-2 та рецепторно-лігандна система FAS (CD95/Apo-1).

Загальною тенденцією щодо кількості апоптотичних клітин у хворих на МДС є їх значна варіабельність, особливо при РА, а також збільшення середнього значення даного показника порівняно з нормою (табл. 2).

Таблиця 2

Рівень експресії апоптоз-асоційованих маркерів клітин КМ хворих на МДС

Діагноз	Маркери апоптозу				
	An^+/PI^-	CD34/CD95	CD14/CD95	CD95	Bcl-2
РА	22,3±21,3 (0,0-86,1)	2,7±0,5 (1,8-4,4)	7,0	86,4±1,8 (80,7-91,0)	17,1±4,2 (8,8-30,3)

РАНБ	17,6±13,3 (0,5-43,9)	3,1±0,5 (1,6-4,3)	-	67,0±8,6# (46,4-92,1)	23,4±11,6 (0,0-58,2)
ХММЛ	17,0±7,4 (0,5-59,3)	15,1	12,7±2,1 (6,1-21,6)	79,1±5,5 (64,0-98,3)	21,4±7,4 (0,0-71,7)
МДС	18,5±6,8 (0,0-86,0)	3,9±1,1 (1,6-15,1)	12,0±2,0 (6,1-21,6)	77,6±3,8 (46,4-98,3)	20,8±4,6 (0,0-71,7)
Контроль	16,3±9,0 (0,5-32,0)	3,1±1,9 (1,0-4,0)	4,6±1,8 (2,7-6,4)	88,2±3,6 (80,0-92,1)	6,5±1,9 (4,6-8,4)

Примітка. # – достовірна відмінність порівняно з РА. Наведені у таблиці дані є інтегральним показником внеску в досліджуваний параметр трьох клітинних популяцій: лімфоїдної, моноцитарної та гранулоцитарної.

Відмічено, що у хворих на РА кількість апоптотичних клітин і клітин, що експресують рецептор CD95, була найбільшою порівняно з такою для групи контролю та інших форм МДС. При цьому пацієнти з РА характеризувались незначним рівнем коекспресії CD34/CD95. У хворих на РАНБ спостерігалось деяке зниження кількості апоптотичних клітин порівняно з РА. Особливо це стосувалось $CD34^+$-клітин, кількість яких, що експресували CD95, була такою ж, як у хворих на РА, не дивлячись на 7-кратне перевищення відносної кількості морфологічно ідентифікованих бластних клітин в КМ хворих на РАНБ. Взагалі при більш просунутих формах МДС виявлено загальне зменшення як рівня апоптозу, так і кількості гемопоетичних клітин, які мали рецептор CD95. При трансформації у ГМЛ у 50% хворих спостерігалось зникнення даного рецептора, на що указують також інші роботи (Bouscary et al., 1997). Найбільш значне зниження рівня експресії CD95 відбувалось в популяції клітин пухлинного клону хворих на РАНБ і мало достовірні розбіжності з аналогічним показником при РА. Не дивлячись на певну тенденцію зниження рівня експресії антигену CD95 при прогресуванні захворювання, даний параметр не мав достовірної кореляції з іншими маркерами апоптотичного процесу (кількістю An^+-клітин і рівнем експресії Bcl-2) в КМ і ПК хворих на МДС, а також достовірного прогностичного значення, що може свідчити на користь багатовекторності регуляції апоптозу в клітині (Eischen C.M. et al., 1997; McGahon A.N. et al., 1998). На відміну від цього, кількість апоптотичних клітин корелювала з загальною виживаністю: пацієнти, у котрих кількість гемопоетичних клітин в апоптозі перевищувала 20% порогове значення, мали більш сприятливий прогноз захворювання. Взагалі, підсилений апоптоз гемопоетичних клітин КМ хворих на МДС був одним з основних диференційно-діагностичних ознак захворювання. На відміну від цього, у більшості пацієнтів на ГМЛ експресія анексину гемопоетичними клітинами КМ не перевищувала 10% порогове значення.

Аналіз рівня експресії антиапоптотичного білка Bcl-2 виявив наступну тенденцію: найменше його значення спостерігалося в групі РА (60% випадків були Bcl-2-негативними) з поступовим підвищенням при

більш просунутих формах МДС, особливо в популяції пухлинного клону. Однак, всі хворі на МДС мали значно більший рівень експресії Bcl-2 відносно контролю. Причому, якщо підвищення кількості апоптотичних клітин було незначним порівняно з нормою, то збільшення кількості Bcl-2^{+}-клітин перевищувало нормативні значення у 3 рази. Інформативним показником перебігу захворювання є оцінка співвідношення рівнів експресії анти- і проапоптотичних маркерів, що вважали за доцільне інші дослідники [Parker J.E. et al., 2000; Boudard D., 2002]. Тому в якості маркерної ознаки ми пропонуємо співвідношення середніх значень рівня експресії Bcl-2 до рівня експресії аннексіну для кожного окремого варіанту МДС $\frac{\text{Bcl-2}}{\text{An}^{+}/\text{PI}^{-}}$. Еволюція захворювання (РАНБ і ХММЛ) супроводжувалася збільшенням, в порівнянні з РА, значення даного показника (за рахунок зростання рівня експресії Bcl-2) – в 1,5 рази при ХММЛ і в 2 рази при РАНБ, що свідчить про блокування апоптотичних процесів внаслідок порушення їх регуляції в менш диференційованих клітинах. Ці результати підтверджуються дослідами Shetty V. et al. (2000) щодо наявності масивного апоптозу більш зрілих гемопоетичних клітин у хворих на МДС. Нами не встановлено достовірного взаємозв'язку між виживаністю хворих на МДС та показником рівня експресії Bcl-2. У хворих на ГМЛ основною відзнакою було значне підвищення Bcl-2^{+}-клітин в порівнянні з МДС (в 1,5 рази) та контролем (в 5 разів), що мало достовірне прогностичне значення (рис. 2).

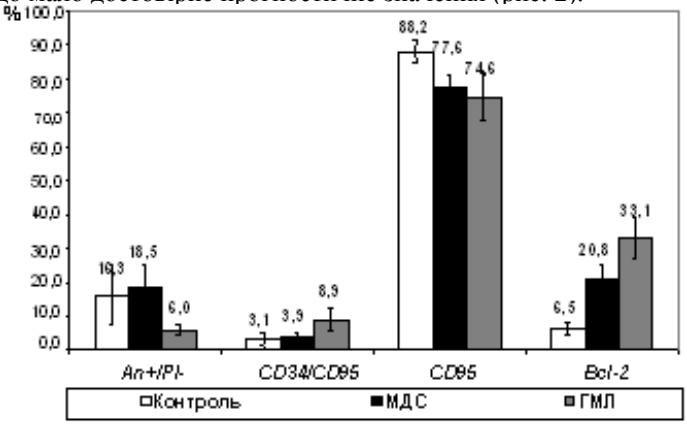


Рис. 2. Рівень експресії апоптоз-асоційованих маркерів гемопоетичних клітин хворих на МДС та ГМЛ.

Таким чином, при співставленні рівня експресії анти- і проапоптотичних маркерів КМ хворих на МДС було відмічено збільшення, в порівнянні з контролем, як апоптотичних, так і блокуючих апоптоз процесів, але ці процеси відбувалися з різним ступенем вираженості.

Характеристика параметрів КЦ хворих на МДС. *Показники КЦ* гемопоетичних клітин хворих на МДС свідчать про їх високий проліферативний потенціал (фази S+G2/M), який майже у 2 рази перевищує контрольні значення (табл. 3). У хворих на РА величина пулу проліферуючих клітин була найбільшою серед інших форм МДС. При малігнізації процесу (більш просунуті форми МДС) спостерігалося деяке зниження фракції проліферуючих клітин КМ у хворих на РАНБ і ХММЛ з наближенням до нормальних величин у хворих на РАНБ. Інформативним показником, що відображає динаміку цитокінетичних процесів при різних формах МДС, є співвідношення $\frac{G0/1}{S+G2/M}$, яке мало більш низьке значення у хворих на МДС в порівнянні з контролем (Mann-Whitney, p=0,08).

Таблиця 3

Кількість клітин в різних фазах КЦ у хворих на диплоїдний варіант МДС

ДІАГНОЗ	ПАРАМЕТРИ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ				
	G0/1	S	G2/M	S+G2/M	$\frac{G0/1}{S+G2/M}$
РА	74,10±3,75	20,42±3,15	5,48±1,66	25,90±3,75	3,71±1,23
РАНБ	85,00±3,84	11,46±2,70	3,55±1,35	15,01±3,84	6,67±1,32
ХММЛ	77,09±4,81	17,85±4,02	5,06±1,48	22,91±4,81	6,75±3,22
МДС	77,85±2,67	17,29±2,20	4,86±0,88	22,15±2,67	5,72±1,49
КОНТРОЛЬ	85,36±2,00	11,92±1,66	2,72±0,42	14,64±2,00	6,20±0,90

При оцінці індивідуальних та середніх показників КЦ було відмічено досить великий розкид їх значень в групі хворих на МДС, на відміну від групи практично здорових осіб, де спостерігалася достатньо висока стійкість значень цих параметрів. Це може свідчити про стабільність процесів кровотворення в нормі та наявність неефективного гемопоезу при МДС.

Було відмічено, що найбільш гетерогенною за всіма вимірюваними параметрами КЦ виявилася група хворих на ХММЛ внаслідок наявності двох варіантів даного захворювання: з мієлодиспластичними (МДС-ХММЛ) та мієлопроліферативними (МПЗ-ХММЛ) ознаками гемопоезу, які відрізнялися кількістю проліферуючих клітин. А саме, було констатовано збільшення пулу проліферуючих клітин КМ у хворих на МПЗ-ХММЛ в порівнянні з таким при МДС-ХММЛ, що може мати значення в плані кращої сприйнятливості до терапії хворих з мієлопроліферативними ознаками гемопоезу.

У 18% хворих на МДС в КМ виявлено ДНК-анеуплоїдію, яка була притаманна тільки пацієнтам з МПЗ-ХММЛ (рис. 3) і значно погіршувала термін їх загальної виживаності. При цьому важливим показником є величина самої анеуплоїдної фракції.

Для оцінки проліферативної активності різних клітинних популяцій хворих на МДС було проведено кореляційний аналіз за Спірманом. Виявлено наявність зворотної кореляції між кількістю бластних клітин і загальною (як диплоїдною, так і анеуплоїдною) величиною проліферуючого пулу гемопоетичних клітин. З іншого боку, відносна кількість бластів має прямий взаємозв'язок з загальною величиною фази спокою G0/1 КМ.

Таким чином, накопичення бластних клітин у фазі G0/1 свідчить про залежність величини фази спокою від величини диплоїдної і анеуплоїдної пухлинної маси в КМ хворих на МДС. Мабуть, за відсутності анеуплоїдної фракції, проліферативний потенціал КМ підтримується за рахунок більш зрілих клітин мієлоїдної лінії гемопоезу. За наявності анеуплоїдної популяції, проліферативний потенціал КМ забезпечується всіма її клітинами, перш за все анеуплоїдними бластами, оскільки існує позитивна кореляція між їх кількістю та величиною проліферативного потенціалу анеуплоїдної популяції. При цьому, величина проліферуючого клітинного пулу для анеуплоїдних варіантів захворювання має вище значення ((28,69±7,26)% клітин) в порівнянні з диплоїдними варіантами ((22,15±2,67)% клітин). Тому можна припустити, що збільшення пухлинної маси відбувається, перш за все, за рахунок анеуплоїдної фракції клітин (якщо така є). Дана тенденція підтверджується наявністю прямого, статистично значущого взаємозв'язку між кількістю бластів в мієлограмі хворих на МДС і відносною величиною анеуплоїдії. У хворих на ГМЛ de novo простежується достовірна залежність величини пулу проліферуючих клітин від величини (збереження) еритроїдного паростка кровотворення.

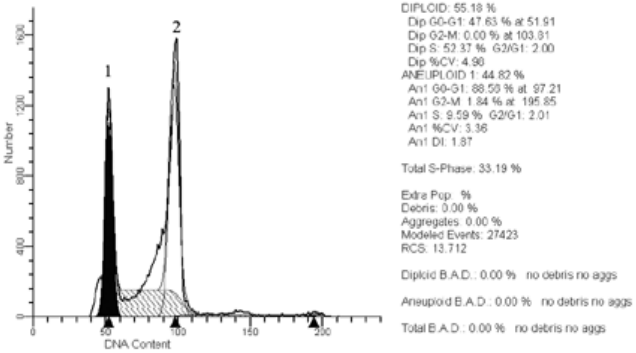


Рис. 3. ДНК-гістограма клітин КМ хворого на ХММЛ: 1 – диплоїдна, 2 – анеуплоїдна популяція клітин.

Згідно регресійного аналізу за Коксом, величина фази спокою, проліферуючого пулу та їх співвідношення мали прогностичне значення. Для кожного прогностичного параметру КЦ визначали порогове значення, від-

повідно до якого хворих поділяли на дві групи, що достовірно відрізнялися за загальною виживаністю: хворі, в КМ яких було понад 14,6% проліферуючих клітин, мали більш сприятливий прогноз захворювання; з іншого боку, величина фази спокою вище 85%, а значення цитокінетичного показника $\frac{G0/1}{S+G2/M}$ більше 6,2 відповідали меншій тривалості життя. На відміну від хворих на МДС, в групі хворих на ГМЛ de novo прогностичним маркером була наявність анеуплоїдії, оскільки основним її джерелом є бластні клітини.

Таким чином, у хворих на МДС було визначено маркерні морфоцитохімічні, імунофенотипові, апоптотичні та цитокінетичні параметри, які при співставленні з клініко-гематологічними, цитогенетичними показниками є диференційно-діагностичними критеріями та відображають перебіг і прогноз захворювання.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі щодо ролі апоптозу і проліферативної активності в патогенезі МДС, які недостатньо вивчені внаслідок біологічної неоднозначності їх регуляторних процесів, значної варіабельності проявів і складнощах верифікації патології.

1. Підтверджено гіпотезу щодо ролі порушення регуляції апоптозу як однієї з ключових ланок патогенезу МДС. Встановлено підвищення кількості апоптотичних клітин при МДС в порівнянні з практично здоровими особами і ГМЛ. Посилений апоптоз гемопоетичних клітин є основною відмітною ознакою у хворих на МДС.

2. Виявлено дисбаланс про- і антиапоптотичних процесів в гемопоетичних клітинах КМ хворих на МДС, що характеризується зміною рівнів експресії апоптоз-ассоційованих маркерів в порівнянні з контролем: антиапоптотичного білка Bcl-2 (підвищенням в 3 рази) і рецепторної молекули FAS (зниженням в 1,2 рази). У хворих на ГМЛ рівень експресії білка Bcl-2 гемопоетичними клітинами зростав у порівнянні з аналогічним показником при МДС (у 1,5 рази) та в порівнянні з контрольною групою (у 5 разів).

3. Встановлено, що підвищений рівень експресії білка Bcl-2 спостерігався в популяції незрілих клітин КМ хворих на МДС, тоді як апоптотичному процесу піддавалися зрілі клітини всіх паростків гемопоезу.

4. Виявлено прогностичну значимість апоптотичного індексу для оцінки загальної виживаності хворих на МДС: збільшення кількості апоптотичних клітин понад 20% порогового значення корелює зі сприятливим прогнозом.

5. Доведено, що МДС є захворюванням, яке характеризується не тільки збільшеним рівнем апоптозу, але й високим проліферативним потенціалом, що відрізняється значною варіабельністю. Параметри клітинного циклу і плоїдності при МДС є важливими маркерами ступеня злоякісності захворювання, а також мають прогностичне значення для

оцінки загальної виживаності хворих. Встановлено, що збільшення кількості клітин у фазі спокою G0/1 відповідає накопиченню пухлинної маси (бластних клітин), а високий проліферативний потенціал є притаманним більш зрілим мієлоїдним клітинам.

6. Виділено прогностично маркерні параметри клітинного циклу і плоїдності. Показано, що ознаками несприятливого прогнозу загальної виживаності хворих на МДС є: величина проліферуючого пулу гемопоетичних клітин S+G2/M менша за 14,6%, фаза спокою G0/1 більша за 85%, значення цитокінетичного показника $\frac{G0/1}{S+G2/M}$ більше за 6,2, а також наявність анеуплоїдної популяції клітин.

7. Констатовано наявність взаємозв'язаних з апоптоз-ассоційованими маркерами кількісних і якісних змін морфофункціональних характеристик гемопоетичних клітин у хворих на МДС, які корелюють з несприятливим прогнозом захворювання: вірогідне звуження гранулоцитарного паростка кровотворення (менше 33%); зниження рівня активності МП в зрілих клітинах мієлоїдного ряду з одночасним підвищенням в них активності КФ і появою відсутньої в нормі НЕ; збереження аномально високої експресії антигену клітин-попередників CD33 і зниженої експресії активаційного антигену CD45 в популяції зрілих мієлоїдних клітин.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Комиссаренко В.Г., Братусь Г.Г., Зверкова А.С., Дарчук Г.Ф., Гащук А.П., Ружинская Е.Э., Джевадова И.В. Критерии нарушений противоопухолевой резистентности организма у лиц с дисгемопоэзом // Врачебное дело. – 1998. – №7. – С. 74-79.

Дисертант приймала участь в оцінці якісних ознак дисгемопоезу на підставі даних лейкограми хворих на МДС.

2. Исакова Л.М., Ружинская Е.Э., Гордиенко А.И. Роль апоптоза в патогенезе миелодиспластического синдрома // Гематологія і переливання крові. – 2004. – №32. – С. 37-47.

Дисертантом проведено аналіз літературних джерел щодо теми роботи, наведені дані інших дослідників, представлені особисті дані стосовно кількості апоптотичних клітин у хворих на МДС.

3. Ісакова Л.М., Шороп Є.В., Дарчук Г.Ф., Комісаренко В.Г., Ружинська О.Е., Гордієнко А.І. Особливості морфо-функціонального стану нейтрофільних гранулоцитів у хворих на МДС // Український журнал гематології та трансфузіології. – 2006. – №2. – С. 20-25.

Дисертантом оцінено рівень активності основних цитохімічних реакцій в нейтрофільних гранулоцитах хворих на МДС.

4. Ісакова Л.М., Дарчук Г.Ф., Зверкова А.С., Ружинская Е.Э., Шороп Е.В. Особенности гемодепрессии и цитохимических параметров

клеток периферической крови и костного мозга у больных МДС в зависимости от формы заболевания // Український журнал гематології та трансфузіології. – 2006. – №6. – С. 16-20.

Дисертантом здійснено аналіз ензимохімічної організації гемопоетичних клітин КМ хворих на МДС.

5. Ружинская Е.Э., Исакова Л.М., Третяк Н.Н. Цитокинетические особенности гемопоэза больных МДС // Онкология. – 2007. – Т. 9, №1. – С. 43-47.

Дисертантом охарактеризовано сучасний стан проблеми і наведено дані власних досліджень щодо параметрів клітинного циклу хворих на МДС.

6. Декл. патент на корисну модель UA №4616, МКП 7 G01N33/48, G01N33/53. Спосіб діагностики мієлодиспластичного синдрому: Зверкова А.С., Ружинська О.Е., Ісакова Л.М.; Інститут гематології та трансфузіології АМН України. – №20040605010; Заявл. 24.06.2004; Опубл. 17.01.2005, Бюл. №1. – 3 с.

7. Перехрестенко П.М., Зверкова А.С., Дарчук Г.Ф., Братусь Г.Г., Комиссаренко В.Г., Коваль А.И., Гащук А.П., Ружинская Е.Э., Джевадова И.В. Миелодиспластический синдром и его проявления // Гематологія і переливання крові. – 1998. – №29. – С. 3-10.

8. Исакова Л.М., Гордиенко А.И., Третяк Н.Н., Ружинская Е.Э., Басова О.В., Борозенец Н.И. Динамика экспрессии FAS-рецептора на бластных клетках больных острой миелоидной лейкемией // Імунологія та алергологія. – 2000. – №4. – С. 54-55.

9. Зверкова А.С., Джевадова И.В., Дарчук Г.Ф., Комиссаренко В.Г., Ружинская Е.Э. Морфологические и цитохимические особенности клеток крови и костного мозга у лиц с дисгемопоэзом //Экспериментальная онкология. – 2000. – Vol. 22, suppl. – 1273.

10. Исакова Л.М., Зверкова А.С., Дарчук Г.Ф., Ружинская Е.Э., Гордиенко А.И. Особенности кроветворения у больных хроническим миеломоноцитарным лейкозом // Х з'їзд онкологів України. – Київ: ТОВ "Абсолют", 2001. – С. 258.

11. Ружинская Е.Э., Гордиенко А.И., Исакова Л.М. Изучение пролиферативной активности и апоптоза гемопоэтических клеток у больных с миелодиспластическим синдромом // Гематологія і переливання крові. – 2001. – №30. – С. 84.

12. Исакова Л.М., Гордиенко А.И., Ружинская Е.Э., Третяк Н.Н., Горяинова Н.В. Изучение маркеров апоптоза гемопоэтических клеток больных хронической миеломоноцитарной лейкемией // Рос. научно-практ. конф. "Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии". – Санкт-Петербург, 2002. – С. 115-116.

13. Зверкова А.С., Дарчук Г.Ф., Исакова Л.М., Гордиенко А.И., Ружинская Е.Э. Особенности гранулоцитарного ростка кроветворения у больных с миелодиспластическим синдромом (МДС) // Проблемы гематологии и переливания крови. – 2002. – №1. – С. 30.

14. Гордієнко А.І., Ружинська О.Е., Ісакова Л.М. Апоптоз мононуклеарів кісткового мозку та периферичної крові хворих на мієлодиспластичний синдром // Зб. наук. праць співр. КМАПО ім. П.Л. Шупика. – 2004. – Вип. 13, кн. 3. – С. 207-211.

15. Ісакова Л.М., Ружинська О.Е., Павлюк Р.П., Гордієнко А.І., Третяк Н.М. Мієлодиспластичний синдром: перебіг захворювання в залежності від віку // IV національний конгрес геронтологів і геріатрів України "Проблемы старения и долголетия". – Київ: ООО "Велес", 2005. – Т. 14 (приложение). – С. 181.

16. Ружинская Е.Э., Исакова Л.М. Анализ клеточного цикла гемопоэтических клеток костного мозга и периферической крови больных миелодиспластическим синдромом и острой миелоидной лейкемией // Укр. ж. гематології та трансфузіології. – 2006. – №2 (додатковий). – С. 55-57.

АНОТАЦІЯ

Ружинська О.Е. **Морфофункціональна характеристика гемопоетичних клітин, особливості їх апоптозу та проліферативної активності при мієлодиспластичному синдромі.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.01.31 – гематологія та трансфузіологія. – ДУ "Інститут гематології та трансфузіології АМН України", Київ, 2007.

У дисертації наведено матеріал щодо морфологічних, цитохімічних, імунофенотипових особливостей, рівня експресії апоптоз-асоційованих маркерів (анексіну V, АГ CD95, білка Bcl-2) та параметрів КЦ гемопоетичних клітин у хворих на різні форми МДС.

Для хворих було характерним порушення морфологічних ознак клітин КМ і ПК, їх ензимохімічної організації та рівня експресії деяких поверхневих антигенів, що відображає функціональну неповноцінність гемопоетичних клітин при МДС.

Відмічено високий рівень апоптозу гемопоетичних клітин у хворих на МДС, що є їх маркерною ознакою. Встановлено залежність кількості апоптотичних клітин в КМ пацієнтів від форми захворювання. Даний параметр має достовірне прогностичне значення.

Однією з причин експансії пухлинного клону є значне зростання рівня експресії антиапоптотичного білка Bcl-2 бластними клітинами при зниженні кількості $CD95^{+}$-клітин в процесі прогресування захворювання. При цьому було відмічено перевищення кількості $Bcl\text{-}2^{+}$-клітин над кількістю апоптотичних клітин у хворих на МДС.

Отримані дані щодо високого проліферативного потенціалу гемопоетичних клітин та значної варіабельності показників їх КЦ у хворих на МДС. Параметри КЦ та наявність анеуплоїдної популяції клітин мають прогностичне значення для оцінки загальної виживаності хворих.

Ключові слова: МДС, гемопоетичні клітини, морфологія, цитохімія, імунофенотип, апоптоз-асоційовані маркери, параметри КЦ, виживаність.

АННОТАЦИЯ

Ружинская Е.Э. **Морфофункциональная характеристика гемопоэтических клеток, особенности их апоптоза и пролиферативной активности при миелодиспластическом синдроме**. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.31 – гематология и трансфузиология. – ГУ “Институт гематологии и трансфузиологии АМН Украины”, Киев, 2007.

В диссертации представлен анализ морфологических, цитохимических, иммунофенотипических особенностей, уровня экспрессии апоптоз-ассоциированных маркеров (аннексина V, АГ CD95, белка Bcl-2) и параметров КЦ гемопоэтических клеток у больных различными формами МДС.

Изучались показатели гемограмм, миелограмм, уровень активности МП, КФ, НЭ, гликогена в гемопоэтических клетках КМ и ПК, уровень экспрессии антигенов CD34, HLA-DR, CD33, CD13, CD14, CD45. Установлено увеличение активности МП, лизосомальных ферментов (КФ и НЭ) в бластных клетках, снижение, а иногда и полное отсутствие активности МП в зрелых клетках гемопоэза, значительное повышение активности КФ во всех гемопоэтических клетках, выявление отсутствующей в норме активности НЭ в НГ, а также падение ее активности в моноцитарных клетках; наличие миелоидной коммитации клеток опухолевого клона, сохранение аномально высокой экспрессии АГ клеток-предшественников CD33 на зрелых гемопоэтических клетках при снижении на них уровня экспрессии активационного АГ CD45, что может свидетельствовать о проявлении функциональной неполноценности лейкоцитов при МДС. Некоторые морфофункциональные параметры клеток имели прогностическую ценность в оценке общей выживаемости больных: относительное количество бластных клеток и НГ КМ, уровень активности МП в бластах и НГ, КФ в бластных клетках, уровень экспрессии антигенов CD45 и CD14.

Анализ уровня экспрессии апоптоз-ассоциированных белков у больных МДС продемонстрировал различие в количестве гемопоэтических клеток, подвергающихся апоптозу, а также в уровне экспрессии про- и антиапоптотических маркеров между РА и более продвинутыми формами заболевания (РАИБ и ХММЛ). У больных РА отмечался наиболее высокий, по сравнению с другими группами, уровень экспрессии FAS-рецептора (CD95) на гемопоэтических клетках КМ и ПК, являющихся субстратом опухолевого клона, при более низком уровне экспрессии в них белка Bcl-2. По мере прогрессирования заболевания происходило значительное увеличение соотношения анти- и проапоптотических маркеров вследствие нарастания опухолевой массы с высоким уровнем экспрессии протоонкогена Bcl-2 и одновременным снижением количества клеток, экспрессирующих FAS-рецептор. Независимо от варианта МДС, при сопоставлении уровней

экспрессии про- и антиапоптотических маркеров отмечалось некоторое преобладание уровня экспрессии последних с наибольшим значением при РАИБ. Количество клеток в апоптозе оказалось прогностически маркерным показателем для больных МДС: увеличение его значения более 20% порога соответствовало более длительному периоду общей выживаемости.

Получены данные относительно высокого пролиферативного потенциала гемопоэтических клеток (S+G2/M), превышающего контрольные значения. Пролиферативная активность КМ при МДС поддерживается, вероятно, за счет более зрелых миелоидных клеток, а при наличии анеуплоидной популяции – всех гемопоэтических клеток анеуплоидного клона. Величина фазы покоя G0/1 КМ является отражением величины опухолевой массы (количества бластных клеток) как анеуплоидной (прежде всего), так и диплоидной популяции клеток. Соотношение $\frac{G0/1}{S+G2/M}$, отображающее эволюцию заболевания, является маркерным: наиболее низкое значение данного цитокинетического параметра отмечалось у больных РА и возрастало при малигнизации процесса (РАИБ, ХММЛ) по мере накопления в КМ бластных клеток. Кроме того, при МДС наблюдается снижение стабильности, относительно контроля, основных показателей КЦ с довольно значительной вариабельностью пролиферативной активности гемопоэтических клеток КМ, что соответствует наличию неэффективного гемопоэза. Сопоставление значений основных параметров КЦ с продолжительностью наблюдения за больными дало возможность выявить прогностически маркерные цитокинетические показатели.

Ключевые слова: МДС, гемопоэтические клетки, морфология, цитохимия, иммунофенотип, апоптоз-ассоциированные маркеры, параметры КЦ, выживаемость.

SUMMARY

Ruzhinskaya E.E. **Morphofunctional characteristic of haematopoietic cells, features of their apoptosis and proliferative activity at the myelodysplastic syndrome.** – Manuscript.

Ph.D thesis to possess a scientific level of Biological Sciences Candidate on specialization 14.01.31 – Haematology and Transfusiology. – The State organization “Institute of Haematology and Transfusiology” of the Ukrainian Academy of Medical Sciences, Kyiv, 2007.

The data related to morphological, cytochemical and immunophenotype features of haematopoietic cells, level of apoptosis associated markers expression (i.e. Annexin V, CD95 antigen and Bcl-2 protein) and cell cycle parameters at different forms MDS patients are presented in the Ph.D. thesis.

The abnormalities of BM and PB cells morphological peculiarities, enzyme status and some surface antigens expression level were characteristic for patients, the haematopoietic cells functional anomaly in MDS patients being reflected.

The high level of apoptosis of haematopoietic cells was detected in MDS patients to be their marker feature. The amount of bone marrow apoptotic cells was found to depend on the form of disease. This parameter has the prognostic significance.

One of the causes of malignancy clone expansion is considerable Bcl-2 expression level increase in blast cells and simultaneous decrease of $CD95^{+}$-cells amount during disease progress. The amount of $Bcl\text{-}2^{+}$-cells was found to exceed apoptotic cells amount in MDS patients.

High proliferative potential and considerable cell cycle variability of haematopoietic cells were proved in MDS patients. Cell cycle parameters and aneuploid population occurrence were discovered to have prognostic significance for MDS patients survival.

Keywords: MDS, haematopoietic cells, morphology, cytochemistry, immunophenotype, apoptosis associated markers, cell cycle parameters, survival.

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

АГ	–	антиген
ГМЛ	–	гостра мієлоїдна лейкемія
ДНК	–	дезоксірібонуклеїнова кислота
КМ	–	кістковий мозок
КФ	–	кисла фосфатаза
КЦ	–	клітинний цикл
МДС	–	мієлодиспластичний синдром
МКАТ	–	моноклональні антитіла
МП	–	мієлопероксидаза
МПЗ	–	мієлопроліферативні захворювання
НГ	–	нейтрофільні гранулоцити
НЕ	–	неспецифічна естераза
ПК	–	периферична кров
РА	–	рефрактерна анемія
РАКС	–	рефрактерна анемія з кільцевими сидеробластами
РАНБ	–	рефрактерна анемія з надлишком бластів
РАНБ–т	–	рефрактерна анемія з надлишком бластів у стадії трансформації
СЦК	–	середній цитохімічний коефіцієнт
DI	–	індекс ДНК
FAB	–	Франко-американо-британська класифікація
FSC	–	пряме світлорозсіювання
PAS	–	цитохімічна реакція на наявність глікогену
PI	–	пропідій йодид
SSC	–	бокове світлорозсіювання

Підписано до друку 31.08.2007 р. Формат 60×84/16. Обсяг 1,25 друк. арк. Зам. №274. Наклад 100.

Друкарня НМУ, Київ – 57, проспект Перемоги, 34